

Исследование молекулярно-клеточных механизмов фиброзирования печени крыс при посттоксическом гепатозе смешанной этиологии и при применении окисленного декстрана

М.А. Карпов^{1, 2}, А.П. Надеев^{1, 2}, В.Д. Клочин¹, В.А. Шкурупий¹, С.В. Позднякова²

¹Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Россия

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . В основе развития цирроза печени, вне зависимости от этиологии, лежит процесс фиброза и структурной перестройки органа. Регуляция этого процесса связана с высоким уровнем экспрессии TGF- β и подавлением апоптоза в гепатоцитах. Окисленный декстран (ОД) обладает высокой противofiбротической эффективностью, способен изменять функциональное состояние фагоцитирующей клетки, препятствуя таким образом развитию фиброза, стимулируя репаративные процессы в органах при посттоксических гепатозах и циррозе печени. **Ц е л ь .** Изучение молекулярно-клеточных механизмов влияния ОД на экспрессию белков эпителиально-мезенхимальной транзиции в процессе фиброзирования и формирования цирроза печени при посттоксическом гепатозе у крыс.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . В эксперименте использовали 30 крыс-самцов породы Вистар с массой тела 280–320 г. Животных разделили на 2 группы. Крысам 1-й группы (гепатоз) посттоксический гепатоз моделировали путем введения раствора CCl_4 и этилового спирта. Животным 2-й группы посттоксический гепатоз моделировали аналогичным способом, что и крысам 1-й группы, и вводили ОД. Подсчитывали численную плотность (Nai) непаренхиматозных клеток печени, экспрессирующих TGF- β (клеток Купфера, эндотелиоцитов, фибробластов). Экспрессию Е-кадгерина, виментина, SNAIL + SLUG оценивали в фибробластах и гепатоцитах.

Р е з у л ь т а т ы . Численная плотность (Nai) гепатоцитов, экспрессирующих виментин, преобладала в печени крыс 1-й группы (гепатоз), в сравнении с таковой у животных 2-й группы (гепатоз + ОД) на 30-е и 60-е сутки. У животных 1-й (гепатоз) группы на 60-е сутки отмечали в 3 раза меньшую численную плотность гепатоцитов, экспрессирующих Е-кадгерин, в сравнении с таковой у крыс, получавших ОД (2-я группа). У животных 1-й (гепатоз) группы на 30-е и 60-е сутки отмечали в 2 раза и 5 раз большую численную плотность гепатоцитов, экспрессирующих SNAIL + SLUG, в сравнении с таковой у крыс 2-й группы. Численная плотность фибробластов, экспрессирующих виментин, преобладала в печени крыс 2-й группы (гепатоз + ОД), в сравнении с таковой у животных 1-й группы (гепатоз) на 30-е сутки. У животных 1-й (гепатоз) группы на 60-е сутки отмечали в 6 раз большую численную плотность фибробластов, экспрессирующих Е-кадгерин, в сравнении с таковой у крыс, получавших ОД (2-я группа). У животных 1-й (гепатоз) группы на 30-е и 60-е сутки отмечали в 6 и 7 раз большую численную плотность фибробластов, экспрессирующих SNAIL + SLUG, в сравнении с таковой у крыс, получавших ОД (2-я группа). В печени животных 2-й группы (гепатоз + ОД) численная плотность клеток, экспрессирующих TGF- β , была меньшей в сравнении с таковой у животных 1-й группы (гепатоз) в 2.5 раза – на 30-е сутки и в 3.6 раза – на 60-е сутки эксперимента.

З а к л ю ч е н и е . При посттоксическом гепатозе в паренхиматозных и непаренхиматозных клетках печени возрастает экспрессия белков TGF- β , SNAIL + SLUG и виментина, способствуя обретению клетками мезенхимального иммунофенотипа, что приводит к усилению профибротических эффектов и формированию цирроза печени. Применение ОД при посттоксическом гепатозе снижает экспрессию виментина, TGF- β и белков эпителиально-

Поступила в редакцию 27.04.2023
Прошла рецензирование 31.05.2023
Принята к публикации 08.06.2023

Автор, ответственный за переписку
Карпов Михаил Александрович: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: karpov-ma@mail.ru

Received 27.04.2023
Revised 31.05.2023
Accepted 08.06.2023

Corresponding author
Mikhail A. Karpov: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: karpov-ma@mail.ru

мезехимальной транзиции в паренхиматозных и непаренхиматозных клетках печени, что уменьшает выраженность фибропластических процессов и препятствует развитию цирроза печени.

Ключевые слова: токсический гепатоз, цирроз печени, крысы, окисленный декстран, эпителиально-мезенхимальная транзиция, TGF- β .

Образец цитирования: Карпов М.А., Надеев А.П., Клочин В.Д., Шкурупий В.А., Позднякова С.В. Исследование молекулярно-клеточных механизмов фиброзирования печени крыс при посттоксическом гепатозе смешанной этиологии и при применении окисленного декстрана // Journal of Siberian Medical Sciences. 2023;7(2):128-137. DOI: 10.31549/2542-1174-2023-7-2-128-137

Investigation of molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis in rats with post-toxic hepatitis of various etiologies and with the use of oxidized dextran

M.A. Karpov^{1, 2}, A.P. Nadeev^{1, 2}, V.D. Klochin¹, V.A. Shkurupiy¹, S.V. Pozdnyakova²

¹Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . The development of liver cirrhosis, regardless of etiology, is based on the process of fibrosis and structural alteration of the organ. Regulation of this process is associated with a high level of TGF- β expression and suppression of apoptosis in hepatocytes. Oxidized dextran (OD) has a high antifibrotic activity and is able to change the functional state of the phagocytic cell, thus preventing the development of fibrosis and stimulating reparative processes in organs with post-toxic hepatitis and liver cirrhosis.

A i m . To study the molecular and cellular mechanisms of the effect of OD on the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-associated proteins during fibrosis and the development of liver cirrhosis in rats with post-toxic hepatitis.

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . In the experiment, 30 male Wistar rats weighing 280–320 g were used. The animals were divided into 2 groups. In group 1 rats (hepatosis), the post-toxic hepatitis was modeled by administration of a solution of CCl₄ and ethyl alcohol. In rats from group 2, the post-toxic hepatitis was modeled in the same way, and OD was administered. The numerical density (Nai) of liver nonparenchymal cells expressing TGF- β (Kupffer cells, endothelial cells, fibroblasts) was calculated. The expression of E-cadherin, vimentin, SNAIL + SLUG by fibroblasts and hepatocytes was evaluated.

R e s u l t s . The numerical density (Nai) of hepatocytes expressing vimentin prevailed in the liver of group 1 rats (hepatosis), compared with that of group 2 animals (hepatosis + OD) on the 30th and 60th days. In animals of the 1st (hepatosis) group on the 60th day, a 3-fold lower numerical density of hepatocytes expressing E-cadherin was noted in comparison with that in rats treated with OD (group 2). In animals of the 1st (hepatosis) group on the 30th and 60th days, a 2-fold and 5-fold higher numerical density of hepatocytes expressing SNAIL + SLUG was noted in comparison with that in rats of the 2nd group. The numerical density of fibroblasts expressing vimentin prevailed in the liver of group 2 rats (hepatosis + OD), compared with that of group 1 animals (hepatosis) on day 30. In animals of the 1st (hepatosis) group on the 60th day, a 6-fold higher numerical density of fibroblasts expressing E-cadherin was noted in comparison with that in rats treated with OD (group 2). In animals of the 1st (hepatosis) group on the 30th and 60th days, the numerical density of fibroblasts expressing SNAIL + SLUG was 6 and 7 times higher than in rats treated with OD (group 2). In the liver of animals of the 2nd group (hepatosis + OD), the numerical density of cells expressing TGF- β was lower in comparison with that of animals of the 1st group (hepatosis) by 2.5 times on the 30th day and 3.6 times on the 60th day of the experiment.

C o n c l u s i o n . In post-toxic hepatitis, the expression of TGF- β , SNAIL + SLUG and vimentin proteins increases in liver parenchymal and nonparenchymal cells, contributing to the acquisition of a mesenchymal immunophenotype by cells, which leads to increased profibrotic activity and the development of liver cirrhosis. The use of OD in post-toxic hepatitis reduces the expression of vimentin, TGF- β and EMT-associated proteins in liver parenchymal and nonparenchymal cells, which decreases the severity of fibroplastic processes and prevents the development of liver cirrhosis.

Keywords: toxic hepatitis, liver cirrhosis, rats, oxidized dextran, epithelial-mesenchymal transition, TGF- β .

Citation example: Karpov M.A., Nadeev A.P., Klochin V.D., Shkurupiy V.A., Pozdnyakova S.V. Investigation of molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis in rats with post-toxic hepatitis of various etiologies and with the use of oxidized dextran. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2023;7(2):128-137. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-7-2-128-137

ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе для цирроза печени характерны высокая частота заболеваемости и летальности [1, 2]. При этом лечение фиброза и цирроза печени носит симптоматический характер и направлено на коррекцию возникающих у пациентов осложнений, а в ряде случаев применяется трансплантация печени [3].

В основе развития цирроза печени, вне зависимости от этиологии, лежит процесс фиброза и структурной перестройки органа. Регуляция этого процесса связана с высоким уровнем экспрессии TGF- β и подавлением апоптоза в гепатоцитах [3]. В качестве основного источника продукции TGF- β рассматривают макрофаги, участвующие в регуляции процессов фиброза [4]. Кроме того, в процессе фиброобразования печени и развития цирроза задействованы механизмы эпителиально-мезенхимальной транзиции (ЭМТ). Этот процесс сопровождается экспрессией белков SNAIL и SLUG и имеет связь с увеличением экспрессии TGF- β [5]. При этом снижается уровень экспрессии компонентов, обеспечивающих клеточные соединения, в частности E-кадгерина, но возрастает экспрессия виментина в эпителиальных клетках печени [6, 7].

Ранее была продемонстрирована высокая противοфибротическая эффективность лизосомотропного вещества – окисленного декстрана (ОД), способного длительно находиться в вакуолярном аппарате макрофага и изменять функциональное состояние фагоцитирующей клетки, способствуя накоплению лизосомальных ферментов и экспрессии матриксных металлопротеиназ (MMPs), их ингибиторов (TIMP), ответственных за деградацию внеклеточного матрикса, препятствуя таким образом развитию фиброза, стимулируя репаративные процессы в органах при различных экспериментальных условиях, в том числе при посттоксических гепатозах и циррозе печени [8]. Однако в ходе проводимых исследований выявили, что экспрессия MMPs и TIMP при посттоксических гепатозах и циррозе печени выражена слабо и не объясняет в полной мере полученный противοфибротический эффект ОД.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение молекулярно-клеточных механизмов влияния ОД на экспрессию белков ЭМТ в процессе фиброобразования и формирования цирроза печени при посттоксическом гепатозе у крыс.

INTRODUCTION

Currently, liver cirrhosis is characterized by high incidence and mortality [1, 2]. At the same time, the treatment of fibrosis and liver cirrhosis is symptomatic and aimed at correction of complications, and in some cases, liver transplantation is used [3].

The development of liver cirrhosis, regardless of etiology, is based on the process of fibrosis and structural alteration of the organ. Regulation of this process is associated with a high level of TGF- β expression and suppression of apoptosis in hepatocytes [3]. Macrophages involved in the regulation of fibrosis are considered the main source of TGF- β production [4]. In addition, the mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) are involved in the process of liver fibrosis and the development of cirrhosis. This process is accompanied by the expression of SNAIL and SLUG proteins and is associated with increased TGF- β expression [5]. At the same time, the level of expression of components providing cellular junctions, in particular E-cadherin, decreases, but the expression of vimentin in liver epithelial cells increases [6, 7].

Previously, a high antifibrotic activity of a lysosomotropic substance, oxidized dextran (OD) was demonstrated of being capable to stay in the vacuolar apparatus of the macrophage for a long time and change the functional state of the phagocytic cell, contributing to the accumulation of lysosomal enzymes and expression of matrix metalloproteinases (MMPs), their inhibitors (TIMP) responsible for the degradation of the extracellular matrix, thus preventing the development of fibrosis, stimulating reparative processes in organs under various experimental conditions, including post-toxic hepatoses and liver cirrhosis [8]. However, the studies conducted showed that the expression of MMPs and TIMP in post-toxic hepatosis and liver cirrhosis is poorly and does not fully explain the antifibrotic activity of OD.

AIM OF THE RESEARCH

To study the molecular and cellular mechanisms of the effect of OD on the expression of EMT-associated proteins during fibrosis and the development of liver cirrhosis in rats with post-toxic hepatosis.

MATERIALS AND METHODS

In the experiment, 30 male Wistar rats weighing 280–320 g were used. The experiment was carried out in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council on the protection of animals used for scientific purposes, the

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали 30 крыс-самцов породы Вистар с массой тела 280–320 г. Эксперимент выполнен в соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, Межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (7-е переиздание, 2019 г.).

Животных разделили на 2 группы. Крысам 1-й группы (гепатоз) посттоксический гепатоз моделировали путем интраперитонеального введения 1 раз в каждые 4 суток 50% масляного раствора CCl_4 в дозе 1 мл/кг массы тела. После каждого такого введения на следующие сутки через поилку вводили 6.5% водный раствор этилового спирта (в среднем 40 мл на крысу). Введение CCl_4 и водного раствора этилового спирта продолжали в течение 60 сут, до формирования цирроза печени с характерными признаками в виде асцита, гидроторакса, геморрагического синдрома и ложными дольками в печени. Животным 2-й группы (гепатоз + ОД) посттоксический гепатоз моделировали так же, как и животным 1-й группы, но, начиная с 1-х суток эксперимента, 1 раз в каждые 4 дня интраперитонеально вводили по 2 мл 5% водного раствора ОД (40 кДа). Введение ОД крысам 2-й группы (гепатоз + ОД) продолжали до 60-х суток. Животных во всех группах на протяжении эксперимента содержали в стандартных условиях вивария на стандартной лабораторной диете и выводили из эксперимента на 30-е и 60-е сутки от начала введения токсических факторов путем декапитации под наркозом из смеси тилетамина (50 мг) и золазепама (50 мг) по 0.1 мл на 100 г массы тела.

Для исследования забирали большую долю печени. После фиксации образцов печени в 10% забуференном нейтральном формалине их подвергали дальнейшей стандартной гистологической обработке: проводили через серию спиртов возрастающей концентрации, заключали в парафин. На микротоме Microm HM355S (Thermo Scientific, США) изготавливали гистологические срезы толщиной 5–6 мкм. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое окрашивание срезов проводили стандартным пероксидазным методом, применяли моноклональные антитела к TGF- β , E-кадгерину, виментину, SNAIL + SLUG в разведении, рекомендованном производителем (Abcam, Великобритания), и докрашивали гематоксилином. Количественную оценку экспрессии

Interstate Standard for the Care of Laboratory Animals (7th reissue, 2019).

The animals were divided into 2 groups. In group 1 rats, the post-toxic hepatitis was modeled by intraperitoneal administration of a 50% CCl_4 oil solution at a dose of 1 ml/kg of body weight once every 4 days. After each administration, on the following day, a 6.5% aqueous solution of ethyl alcohol (on average, 40 ml per 1 rat) was administered using a drinker. The administration of CCl_4 and an aqueous solution of ethyl alcohol was continued for 60 days until the formation of liver cirrhosis with characteristic signs such as ascites, hydrothorax, hemorrhage, and pseudo-lobules in the liver. In group 2 animals (hepatosis + OD), the post-toxic hepatitis was modeled in the same way as in group 1, but since the 1st day of the experiment, 2 ml of a 5% aqueous solution of OD (40 kDa) was administered intraperitoneally once every 4 days. The administration of OD to group 2 rats (hepatosis + OD) was continued for 60 days. Animals in all groups throughout the experiment were kept in standard vivarium conditions on a standard laboratory diet, and were decapitated under tiletamine (50 mg) and zolazepam (50 mg) at a dose of 0.1 ml per 100 g of body weight on the 30th and 60th days from the start of the administration of toxicant solutions.

The large hepatic lobe was taken for the study. After fixation of the liver samples in 10% neutral formalin solution, they were subjected to further conventional tissue processing through ethanol of increasing concentrations, and embedded in paraffin. Serial sections of 5–6 μm were made using a Microm HM355S microtome (Thermo Scientific, USA). Sections were stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemical staining of sections was carried out by the conventional peroxidase method, monoclonal antibodies to TGF- β , E-cadherin, vimentin, SNAIL + SLUG were used in the dilution recommended by the manufacturer (Abcam, Great Britain), and were counterstained with hematoxylin. The quantitative assessment of the expression of the above markers was performed using an AxioStar microscope (Carl Zeiss, Germany) at magnification $\times 400$ using a morphometric grid with a test area of 1600 μm^2 . The numerical density (Nai) of liver nonparenchymal cells expressing TGF- β (Kupffer cells, endothelial cells, fibroblasts) was calculated due to the ability of these cells to produce this marker, their participation in the process of liver fibrosis, inflammation [4]. The expression of E-cadherin, vimentin, SNAIL + SLUG was evaluated in fibroblasts and hepatocytes [9].

Statistical analysis was performed using licensed Microsoft software. The probability of significance of

вышеуказанных факторов проводили с использованием светового микроскопа AxioStar (Carl Zeiss, Германия) при увеличении в 400 раз с использованием морфометрической сетки с тестовой площадью 1600 мкм². Подсчитывали численную плотность (Nai) непаренхиматозных клеток печени, экспрессирующих TGF- β (клеток Купфера, эндотелиоцитов, фибробластов), в связи со способностью этих клеток продуцировать указанный фактор, участием их в процессе фиброзирования печени, воспалении [4]. Экспрессию Е-кадгерина, виментина, SNAIL + SLUG оценивали в фибробластах и гепатоцитах [9].

Статистический анализ проводили с использованием лицензированного программного обеспечения Microsoft. Вероятность достоверности различий средних величин между сравниваемыми признаками оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента, при условии нормального распределения величин в вариационном ряду.

РЕЗУЛЬТАТЫ

За время эксперимента летальных исходов среди животных 1-й и 2-й группы не наблюдали. Макроскопически печень крыс 1-й группы (гепатоз) была плотной, с бугристой узловой поверхностью, тусклого красного цвета. При микроскопическом исследовании печени крыс 1-й (гепатоз) группы обнаруживали фиброз в области портальных трактов, между долек и в толще долек к 30-м суткам. Формирование ложных долек различного размера наблюдали на 60-е сутки эксперимента. У крыс 2-й группы (гепатоз + ОД) на 30-е и 60-е сутки печень макроскопически была гладкой, темно-красного цвета, плотно-эластической консистенции, а при микроскопическом исследовании наблюдали отложение коллагена вокруг портальных трактов, однако в иных локализациях относительно структуры печеночных долек, а также формирования ложных долек не наблюдали.

Численная плотность гепатоцитов, экспрессирующих виментин, преобладала в печени крыс 1-й группы (гепатоз), в сравнении с таковой у животных 2-й группы (гепатоз + ОД) на 30-е и 60-е сутки (табл. 1, рис. 1, А).

У животных 1-й (гепатоз) группы на 60-е сутки отмечали в 3 раза меньшую численную плотность гепатоцитов, экспрессирующих Е-кадгерин, в сравнении с таковой у крыс, получавших ОД (2-я группа) (см. табл. 1, рис. 1, В).

У животных 1-й (гепатоз) группы на 30-е и 60-е сутки отмечали в 2 раза и 5 раз большую численную плотность гепатоцитов, экспрессиру-

ifferences between the compared mean values was determined using the Student's *t*-test, provided that the values were distributed normally in the variation series.

RESULTS

During the experiment, fatal outcomes were not observed among animals of the 1st and 2nd groups. Macroscopically, the liver of group 1 rats (hepatosis) was dense, with a lumpy, nodose surface, dull red in color. Microscopic examination of the liver of rats with hepatosis (group 1) revealed fibrosis at the portal tracts, between the lobules and within the lobules by the 30th day. The formation of pseudo-lobules of various sizes was observed on the 60th day of the experiment. In group 2 rats (hepatosis + OD) on the 30th and 60th days, macroscopically the liver was smooth, dark red in color, solid and elastic, and during microscopic examination the deposition of collagen around the portal tracts was observed, however, in other localizations, with respect to the hepatic lobule structure, it was not found, as well as the formation of pseudo-lobules.

The numerical density of hepatocytes expressing vimentin prevailed in the liver of group 1 rats (hepatosis), in comparison with that of group 2 animals (hepatosis + OD) on the 30th and 60th days (Table 1, Fig. 1, A).

In animals of the 1st (hepatosis) group on the 60th day, a 3-fold lower numerical density of hepatocytes expressing E-cadherin was observed in comparison with that in rats receiving OD (group 2) (Table 1, Fig. 1, B).

In animals of the 1st (hepatosis) group on the 30th and 60th days, a 2-fold and 5-fold higher numerical density of hepatocytes expressing SNAIL + SLUG was noted in comparison with that in rats treated with OD (group 2) (Table 1, Fig. 1, C).

The numerical density of fibroblasts expressing vimentin prevailed in the liver of group 2 rats (hepatosis + OD), compared with that of group 1 animals (hepatosis) on day 30 (Table 2).

In animals of the 1st (hepatosis) group on the 60th day, a 6-fold higher numerical density of fibroblasts expressing E-cadherin was noted in comparison with that in rats treated with OD (group 2) (Table 2).

In animals of the 1st (hepatosis) group on the 30th and 60th days, a 6 and 7 times greater numerical density of fibroblasts expressing SNAIL + SLUG was observed in comparison with that in rats treated with OD (group 2) (Table 2).

It is known that SNAIL + SLUG proteins are involved in disruption of the assembly of cytoskeleton filaments of the epithelial cells, thus contributing

Таблица 1. Численная плотность (Nai) гепатоцитов, экспрессирующих маркеры эпителиально-мезенхимальной транзиции в печени крыс при посттоксическом гепатозе и в условиях коррекции окисленным декстраном ($M \pm m$)
Table 1. Numerical density (Nai) of hepatocytes expressing epithelial-mesenchymal transition markers in the liver of rats with post-toxic hepatitis and treated with oxidized dextran ($M \pm m$)

Показатель Marker	Период наблюдения (сут) Follow-up (day)	1-я группа 1st group	2-я группа 2nd group
Е-кадгерин E-cadherin	30	2.2 ± 0.19	2.9 ± 0.28
	60	1.9 ± 0.15	$5.9 \pm 0.41^*$
Виментин Vimentin	30	0.4 ± 0.12	$0.14 \pm 0.07^*$
	60	0.77 ± 0.19	$0.03 \pm 0.03^*$
SNAIL + SLUG	30	3.7 ± 0.26	1.9 ± 0.28
	60	5.9 ± 0.45	$0.1 \pm 0.05^*$

* Достоверные различия средних величин между 1-й и 2-й группами ($p < 0.05$).

* Differences of average values between the 1st and 2nd groups are significant ($p < 0.05$).

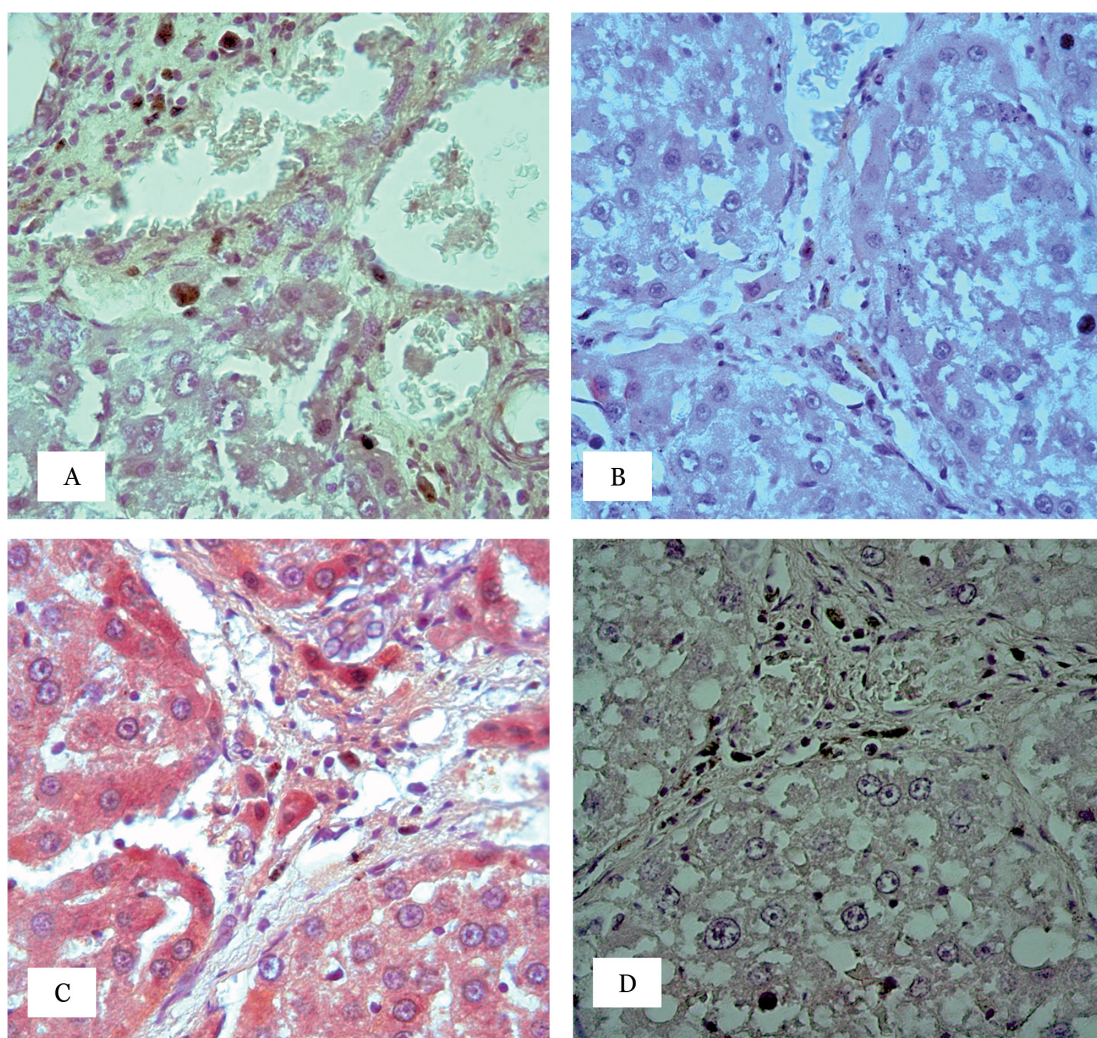


Рис. 1. Экспрессия исследуемых белков непаренхиматозными и паренхиматозными клетками печени крыс 1-й группы (гепатоз) на 60-е сутки эксперимента: А – виментина в гепатоцитах; В – Е-кадгерина в гепатоцитах и фибробластах; С – SNAIL + SLUG в фибробластах и гепатоцитах; D – TGF-β в фибробластах. Докрашивание гематоксилином. Увеличение ×400

Fig. 1. Expression of the studied proteins by liver nonparenchymal and parenchymal cells of group 1 rats (hepatosis) on the 60th day of the experiment: A – vimentin in hepatocytes; B – E-cadherin in hepatocytes and fibroblasts; C – SNAIL + SLUG in fibroblasts and hepatocytes; D – TGF-β in fibroblasts. Counterstaining with hematoxylin. Magnification ×400

Таблица 2. Численная плотность (Nai) фибробластов, экспрессирующих маркеры эпителиально-мезенхимальной трансформации в печени крыс с посттоксическим гепатозом и в условиях коррекции окисленным декстраном ($M \pm m$)
Table 2. Numerical density (Nai) of fibroblasts expressing epithelial-mesenchymal transition markers in the liver of rats with post-toxic hepatosis and treated with oxidized dextran ($M \pm m$)

Показатель Marker	Период наблюдения (сут) Follow-up (day)	1-я группа 1st group	2-я группа 2nd group
Е-кадгерин E-kadherin	30	0.5 ± 0.17	0.2 ± 0.09
	60	1.2 ± 0.27	$0.2 \pm 0.06^*$
Виментин Vimentin	30	0.4 ± 0.14	$1.5 \pm 0.33^*$
	60	1.5 ± 0.37	1.3 ± 0.38
SNAIL + SLUG	30	0.6 ± 0.16	$0.1 \pm 0.08^*$
	60	0.7 ± 0.19	$0.1 \pm 0.07^*$

* Достоверные различия средних величин между 1-й и 2-й группами ($p < 0.05$).

* Differences of average values between the 1st and 2nd groups are significant ($p < 0.05$).

ющих SNAIL + SLUG, в сравнении с таковой у крыс, получавших ОД (2-я группа) (см. табл. 1, рис. 1, С).

Численная плотность фибробластов, экспрессирующих виментин, преобладала в печени крыс 2-й группы (гепатоз + ОД), в сравнении с таковой у животных 1-й группы (гепатоз) на 30-е сутки (табл. 2).

У животных 1-й (гепатоз) группы на 60-е сутки отмечали в 6 раз большую численную плотность фибробластов, экспрессирующих Е-кадгерин, в сравнении с таковой у крыс, получавших ОД (2-я группа) (см. табл. 2).

У животных 1-й (гепатоз) группы на 30-е и 60-е сутки отмечали в 6 и 7 раз большую численную плотность фибробластов, экспрессирующих SNAIL + SLUG, в сравнении с таковой у крыс, получавших ОД (2-я группа) (см. табл. 2).

Известно, что белки SNAIL + SLUG участвуют в нарушении сборки филаментов цитоскелета эпителиальных клеток, таким образом способствуя обретению клеткой мезенхимального или мезодермального иммунофенотипа [10]. Исследование численной плотности клеток, экспрессирующих SNAIL + SLUG, показало, что у крыс 1-й группы (гепатоз) величина исследуемого показателя с 30-х по 60-е сутки возросла на 35 %, тогда как у животных 2-й группы (гепатоз + ОД) численная плотность клеток, экспрессирующих SNAIL + SLUG, уменьшилось на 90 % в аналогичный период эксперимента. При этом численная плотность клеток, экспрессирующих SNAIL + SLUG, на 30-е и 60-е сутки в печени крыс 1-й группы (гепатоз) была на 53 и 97 % большей в сравнении с таковой в печени животных 2-й группы (гепатоз + ОД) (см. табл. 1, рис. 1, С).

to the acquisition by the cell of a mesenchymal or mesodermal immunophenotype [10]. A study of the numerical density of cells expressing SNAIL + SLUG showed that in rats of group 1 (hepatosis), the indicator increased by 35% from the 30th to the 60th day, whereas in animals of group 2 (hepatosis + OD), the numerical density of cells expressing SNAIL + SLUG decreased by 90% in the same time period. At the same time, the numerical density of cells expressing SNAIL + SLUG on the 30th and 60th days in the liver of group 1 rats (hepatosis) was 53 and 97% higher compared to that in the liver of group 2 animals (hepatosis + OD) (Table 1, Fig. 1, C).

In the liver of animals of the 2nd group (hepatosis + OD), a lower numerical density of cells expressing SNAIL + SLUG, in comparison with that of animals of the 1st group (hepatosis), was combined with a less pronounced (2.5 times – on the 30th day and 3.6 times – on the 60th day) expression of TGF- β (Table 3, Fig. 1, D).

DISCUSSION

The results obtained indicate the predominance of cells expressing vimentin in the liver of rats with post-toxic hepatosis (group 1), which is probably associated with the expression of SNAIL + SLUG and TGF- β and contributes to the mesenchymal transformation of liver cells and the progression of fibrosis with the formation of pseudo-lobules [11, 12]. At the same time, the OD has the ability to mediate less active production of TGF- β by liver cells, to prevent the formation of a mesenchymal trend in cell differentiation and the development of liver fibrosis and cirrhosis.

The result of the study demonstrates the involvement of EMT markers in the antifibrotic activity of OD, which is realized in a lower production of TGF- β

Таблица 3. Численная плотность (Nai) непаренхиматозных клеток печени крыс, экспрессирующих TGF- β , при посттоксическом гепатозе и в условиях коррекции окисленным декстраном ($M \pm m$)**Table 3.** Numerical density (Nai) of liver nonparenchymal cells of rats expressing TGF- β in post-toxic hepatitis and treated with oxidized dextran ($M \pm m$)

Показатель Indicator	Период наблюдения (сут) Follow-up (day)	1-я группа 1st group	2-я группа 2nd group
Клетки, экспрессирующие TGF- β Cells expressing TGF- β	30	3.8 ± 0.33	$1.5 \pm 0.22^*$
	60	6.5 ± 0.47	$1.8 \pm 0.18^*$

* Достоверные отличия при сравнении величин 1-й и 2-й группы ($p \leq 0.05$).Differences of average values between the 1st and 2nd groups are significant ($p < 0.05$).

В печени животных 2-й группы (гепатоз + ОД) меньшая численная плотность клеток, экспрессирующих SNAIL + SLUG, в сравнении с таковой у животных 1-й группы (гепатоз), сочеталась с менее выраженной (в 2.5 раза – на 30-е сутки и в 3.6 раза – на 60-е сутки эксперимента) экспрессией TGF- β (табл. 3, рис. 1, D).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты указывают на преобладание клеток, экспрессирующих виментин, в печени крыс с посттоксическим гепатозом (1-я группа), что, вероятно, связано с экспрессией SNAIL + SLUG и TGF- β и способствует «мезенхимальной» трансформации клеток печени и прогрессированию фиброза с образованием ложных долек [11, 12]. Вместе с тем ОД обладает способностью опосредовать менее активную продукцию клетками печени TGF- β , препятствовать формированию «мезенхимальной» направленности дифференцировки клеток и развитию фиброза и цирроза печени.

Результат проведенного исследования демонстрирует участие маркеров ЭМТ в противofiбротической эффективности ОД, которая реализуется в меньшей продукции TGF- β и его индукторов SNAIL + SLUG, что, вероятно, связано с лизосомотропностью и медленной деградацией ОД в вакуолярном аппарате макрофагов, участвующих в ответной реакции на повреждение печени при посттоксическом гепатозе и последующей репарации органа.

Очевидно, что при фиброзе и циррозе печени макрофаги печени имеют явные черты клеток типа M2 [12, 13]. При этом высокая экспрессия TGF- β в непаренхиматозных клетках печени сочеталась со снижением экспрессии E-кадгерина, увеличением экспрессии виментина, отражая проявления ЭМТ как в паренхиматозных, так и непаренхиматозных клетках печени [9]. Можно предположить, что применение ОД приводит к накоплению его в макрофагах, в том

и его индукторов SNAIL + SLUG, which is probably due to lysosomotropic activity and slow degradation of OD in the vacuolar apparatus of macrophages involved in the response to liver damage in post-toxic hepatitis and subsequent organ repair.

It is obvious that in liver fibrosis and cirrhosis, liver macrophages have distinct features of M2 cells [12, 13]. At the same time, the high expression of TGF- β in liver nonparenchymal cells was combined with a decrease in the expression of E-cadherin, an increase in the expression of vimentin, reflecting the manifestations of EMT in both liver parenchymal and nonparenchymal cells [9]. It can be assumed that the use of OD leads to its accumulation in macrophages, including in Kupffer cells, which prevents their expression of TGF- β and its inducers SNAIL + SLUG. In addition, the OD may interfere with the assembly of collagen from tropocollagen by forming strong bonds with aldehyde groups [8]. The decrease in fibroplastic complications in the liver may also be due to a decrease in the expression of TGF- β , SNAIL + SLUG, vimentin in fibroblasts.

CONCLUSION

The study conducted allows us to draw the following conclusions:

1. In post-toxic hepatitis, the expression of TGF- β , SNAIL + SLUG, and vimentin proteins increases in liver parenchymal and nonparenchymal cells, contributing to the acquisition of a mesenchymal immunophenotype by cells, which leads to an increased profibrotic activity and formation of liver cirrhosis.

2. The use of the OD in post-toxic hepatitis reduces the expression of vimentin, TGF- β and epithelial-mesenchymal transition-associated proteins in liver parenchymal and nonparenchymal cells, which decrease the severity of fibroplastic processes and prevents the liver cirrhosis development.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

числе в клетках Купфера, что препятствует экспрессии ими TGF- β и его индукторов SNAIL + SLUG. Кроме того, ОД, возможно, препятствует сборке коллагена из тропоколлагена путем образования прочных связей с альдегидными группами [8]. Снижение фибропластических осложнений в печени может быть также обусловлено уменьшением экспрессии TGF- β , SNAIL + SLUG, виментина в фибробластах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. При посттоксическом гепатозе в паренхиматозных и непаренхиматозных клетках печени

возрастает экспрессия белков TGF- β , SNAIL + SLUG и виментина, способствуя обретению клетками мезенхимального иммунофенотипа, что приводит к усилению профибротических эффектов и формированию цирроза печени.

2. Применение ОД при посттоксическом гепатозе снижает экспрессию виментина, TGF- β и белков эпителиально-мезенхимальной транзиции в паренхиматозных и непаренхиматозных клетках печени, что уменьшает выраженность фибропластических процессов и препятствует формированию цирроза печени.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nilsson E., Anderson H., Sargenti K. et al. Clinical course and mortality by etiology of liver cirrhosis in Sweden: a population based, long-term follow-up study of 1317 patients // *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2019;49(11):1421-1430. DOI: 10.1111/apt.15255.
2. Ye F., Zhai M., Long J. et al. The burden of liver cirrhosis in mortality: Results from the global burden of disease study // *Front. Public Health.* 2022;10:1-13. DOI: 10.3389/fpubh.2022.909455.
3. Гарбузенко Д.В. Современные стратегии таргетной терапии фиброза печени // *Бюллетень сибирской медицины.* 2022;21(3):154-165. DOI: 10.20538/1682-0363-2022-3-154-165.
4. Zhang C., Yang M., Ericsson A.C. Function of macrophages in disease: current understanding on molecular mechanisms // *Front. Immunol.* 2021;12(620510):1-12. DOI: 10.3389/fimmu.2021.620510.
5. Дворяшина И.А., Великородная Ю.И., Терентьев А.В., Загребин В.Л. Эпителиально-мезенхимальный переход I типа как важный биологический процесс в эмбриогенезе // *Вестн. ВолгГМУ.* 2021;2(78):37-45. DOI: 10.19163/1994-9480-2021-2(78)-37-45.
6. Xu W., Wang N.R., Wang H.F. et al. Analysis of epithelial-mesenchymal transition markers in the histogenesis of hepatic progenitor cell in HBV-related liver diseases // *Diagn. Pathol.* 2016;11(1):136. DOI: 10.1186/s13000-016-0587-y.
7. Tennakoon A.H., Izawa T., Kuwamura M., Yamate J. Pathogenesis of type 2 epithelial to mesenchymal transition (EMT) in renal and hepatic fibrosis // *J. Clin. Med.* 2016;5(1):4. DOI: 10.3390/jcm5010004.
8. Карпов М.А., Ключин В.Д., Надеев А.П. и др. Структурные изменения в печени при посттоксическом циррозе и его лечении окисленным декстраном. Иммуногистохимическое исследование // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 2022;174(9):392-395. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-9-392-395.
9. Yang J., Antin P., Berx G. et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2020;21(6):341-352. DOI: 10.1038/s41580-020-0237-9.

REFERENCES

1. Nilsson E., Anderson H., Sargenti K. et al. Clinical course and mortality by etiology of liver cirrhosis in Sweden: a population based, long-term follow-up study of 1317 patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2019;49(11):1421-1430. DOI: 10.1111/apt.15255.
2. Ye F., Zhai M., Long J. et al. The burden of liver cirrhosis in mortality: Results from the global burden of disease study. *Front. Public Health.* 2022;10:1-13. DOI: 10.3389/fpubh.2022.909455.
3. Garbuzenko D.V. Current strategies for targeted therapy of liver fibrosis. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2022;21(3):154-165. DOI: 10.20538/1682-0363-2022-3-154-165. (In Russ.)
4. Zhang C., Yang M., Ericsson A.C. Function of macrophages in disease: current understanding on molecular mechanisms. *Front. Immunol.* 2021;12(620510):1-12. DOI: 10.3389/fimmu.2021.620510.
5. Dvoryashina I.A., Velikorodnaya Yu.I., Terentev A.V., Zagrebina V.L. Type I epithelial-mesenchymal transition as an important biological process in embryogenesis. *Journal of Volgograd State Medical University.* 2021;2(78):37-45. DOI: 10.19163/1994-9480-2021-2(78)-37-45. (In Russ.)
6. Xu W., Wang N.R., Wang H.F. et al. Analysis of epithelial-mesenchymal transition markers in the histogenesis of hepatic progenitor cell in HBV-related liver diseases. *Diagn. Pathol.* 2016;11(1):136. DOI: 10.1186/s13000-016-0587-y.
7. Tennakoon A.H., Izawa T., Kuwamura M., Yamate J. Pathogenesis of type 2 epithelial to mesenchymal transition (EMT) in renal and hepatic fibrosis. *J. Clin. Med.* 2016;5(1):4. DOI: 10.3390/jcm5010004.
8. Karpov M.A., Klochin V.D., Nadeev A.P. et al. Structural changes in the liver in post-toxic cirrhosis and its treatment with oxidized dextran. Immunohistochemical research. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2022;174(9):392-395. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-9-392-395. (In Russ.)
9. Yang J., Antin P., Berx G. et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2020;21(6):341-352. DOI: 10.1038/s41580-020-0237-9.

10. Dongre A., Weinberg R.A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2019;20(2):69-84. DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4.
11. Yu K., Li Q., Shi G., Li N. Involvement of epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis // *Saudi J. Gastroenterol.* 2018;24(1):5-11. DOI: 10.4103/sjg.SJG_297_17.
12. Chen S., Morine Y., Tokuda K. et al. Cancer associated fibroblast induced M2 polarized macrophages promote hepatocellular carcinoma progression via the plasminogen activator inhibitor 1 pathway // *Int. J. Oncol.* 2021;59(2):59. DOI: 10.3892/ijo.2021.5239.
13. Сарбаева Н.Н., Пономарева Ю.В., Милякова М.Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами // *Гены и клетки.* 2016;11(1):9-17.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Карпов Михаил Александрович – канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; ведущий научный сотрудник НИИ экспериментальной и клинической медицины ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-8200-3998.

Надеев Александр Петрович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; ведущий научный сотрудник НИИ экспериментальной и клинической медицины ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-0400-1011.

Ключин Виталий Дмитриевич – научный сотрудник НИИ экспериментальной и клинической медицины ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-5418-1375.

Шкурूपий Вячеслав Алексеевич – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ экспериментальной и клинической медицины ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-5078-4216.

Позднякова Светлана Васильевна – д-р биол. наук, профессор кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-2038-5131.

10. Dongre A., Weinberg R.A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2019;20(2):69-84. DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4.
11. Yu K., Li Q., Shi G., Li N. Involvement of epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis. *Saudi J. Gastroenterol.* 2018;24(1):5-11. DOI: 10.4103/sjg.SJG_297_17.
12. Chen S., Morine Y., Tokuda K. et al. Cancer associated fibroblast induced M2 polarized macrophages promote hepatocellular carcinoma progression via the plasminogen activator inhibitor 1 pathway. *Int. J. Oncol.* 2021;59(2):59. DOI: 10.3892/ijo.2021.5239.
13. Sarbaeva N.N., Ponomareva J.V., Milyakova M.N. Macrophages: diversity of phenotypes and functions, interaction with foreign materials. *Genes and Cells.* 2016;11(1):9-17. (In Russ.)

ABOUT THE AUTHORS

Mikhail A. Karpov – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Departments of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University; Leading Researcher, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-8200-3998.

Alexander P. Nadeev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Departments of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University; Leading Researcher, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-0400-1011.

Vitaly D. Klochin – Researcher, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-5418-1375.

Vyacheslav A. Shkurupiy – Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Academic Advisor, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-5078-4216.

Svetlana V. Pozdnyakova – Dr. Sci. (Bio.), Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-2038-5131.